Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

UPC²を用いた脂溶性ビタミンカプセルの分析

Andrew Aubin
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

- 広範囲の脂溶性ビタミン製剤の迅速分析
- Waters® ACQUITY UPC²™ システムを用い、6つの異なる脂溶性ビタミン製剤の分析を行いました。
- このシステムは、複数の装置や異なる技術を用いることなく、広範囲な脂溶性ビタミン製剤を分析でき、研究室における脂溶性ビタミン分析を大幅に合理化することが可能です。
- それぞれの脂溶性ビタミン製剤について目的物質と医薬品添加剤の迅速な分離に成功しました。
- ビタミン A、ビタミン E、ビタミン K1 の異性体分離に成功しました。

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPC² システム

ACQUITY UPC² カラムキット

ACQUITY UPC² PDA 検出器

Empowe™ 3 ソフトウエア

キーワード

UPC²、脂溶性ビタミン、ビタミン E、ビタミン A、ビタミン D3、ビタミン K1、ビタミン K2

はじめに

脂溶性ビタミン製剤の分析は、オイル状または粉末状の製剤を充填したカプセル、もしくは錠剤であるが故に、しばしば困難な作業を伴います。これらの製剤の分析ではほとんどの場合、購入・廃棄処理共に高価な溶媒（ヘキサン、tert-ブチルアルコール、酢酸エチル、ジクロロメタンなど）を使用する順相液体クロマトグラフィー法が採用されています。他の分析技術としては、逆相液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、および比色分析があります。脂溶性ビタミン分析に UltraPerformance Convergence Chromatography™（UPC²）を用いることは、データの品質を維持しながら、コストと有機溶媒使用量を削減し、分析時間の短縮と、環境に配慮したグリーンテクノロジーを実現する唯一の方法です。本アプリケーションノートでは、ACQUITY UPC² を用いて図 1 に示すビタミン A、ビタミン A + D3、ビタミン E、ビタミン D3、ビタミン K1、ビタミン K2 を含む脂溶性ビタミン製剤の分析を行いました。これらの実験結果は、UPC² がデータ品質に妥協することなく、現在使用されている分析技術のいくつかの代替となり得る可能性を示しています。

有効成分	1 カプセル / 錠剤あたりの量	添加剤
ビタミン A	10,000 IU A	大豆油、ゼラチン、グリセリン、水
ビタミン A+D3	10,000 IU A 2000 IU D3	大豆油、ゼラチン、グリセリン、水
ビタミン D3	2000 IU D3	ヒマワリ油、ゼラチン、グリセリン、水
ビタミン E	400 IU E	大豆油、ゼラチン、グリセリン、水、食用黄色 6 号レーキ、食用青色 1 号レーキ、二酸化チタン
ビタミン K1	100 µg	セルロース、リン酸水素カルシウム、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、クロスカルメロースナトリウム
ビタミン K2	50 µg	セルロース、ステアリン酸マグネシウム、シリカ

表 1　脂溶性ビタミン製剤

分析条件

装置：
ACQUITY UPC^2
ACQUITY UPC^2 バイナリーソルベントマネージャ
サンプルマネージャ
コンバージェンスマネージャ
カラムマネージャ
PDA 検出器

カラム：
ACQUITY UPC^2 BEH 3.0 × 100 mm, 1.7 µm
ACQUITY UPC^2 HSS C_{18} SB 3.0 × 100 mm, 1.8 µm
ACQUITY UPC^2 HSS C_{18} SB 2.1 × 150 mm, 1.8 µm

データシステム：Empower3 ソフトウエア

分析条件：各分析の詳細は、本アプリケーションノートの『結果と考察』に記載。

サンプル調整

オイル充填カプセル剤（ビタミン A、A+D3、D3）それぞれ 4 個の中身をイソオクタン 10 ml で溶解させました。ビタミン E カプセルは中身をイソオクタン 10 ml で溶解させました。ビタミン K 錠剤は 8 つに砕いたものを 30 分間イソオクタンで超音波抽出を行い、沈降後、一定量の抽出物を 1.0 µm ガラス繊維フィルターを用いてバイアル瓶に直接ろ過しました。ビタミン K2 は、粉末充填カプセル8つの中身を出し、イソオクタンで 30 分間超音波抽出を行い、沈降後、一定量の抽出物を 1.0 µm ガラス繊維フィルターを用いてバイアル瓶に直接ろ過しました。

結果と考察

ビタミンA

魚肝油由来とラベル表示されたビタミン A 製剤には、添加剤として大豆油、ゼラチン、グリセリン、水を含んでいました。ビタミン A パルミチン酸エステルの 2 つの主要なピーク（シス体とトランス体の異性体、それぞれ 1.325 分と 1.394 分）は、添加剤の小さなピークとの良好な分離を示しました。添加剤のピークは、図 1 に示すように、いずれも 2.0 から 2.5 分の範囲内に溶出しています。この分離では、アクティブバックプレッシャーレギュレーター（ABPR）を 2176 psi に設定し、CO_2 / メタノール（0.2% ギ酸を含む）比率 97:3 から 90:10 まで 3 分強のグラジエントを行いました。分析条件詳細を表 2 に示します。図 2 に示しますように、表 2 の分析条件を用いてビタミン A 酢酸エステルとビタミン A パルミチン酸エステルおよび、レチノールを容易に分離することができました。

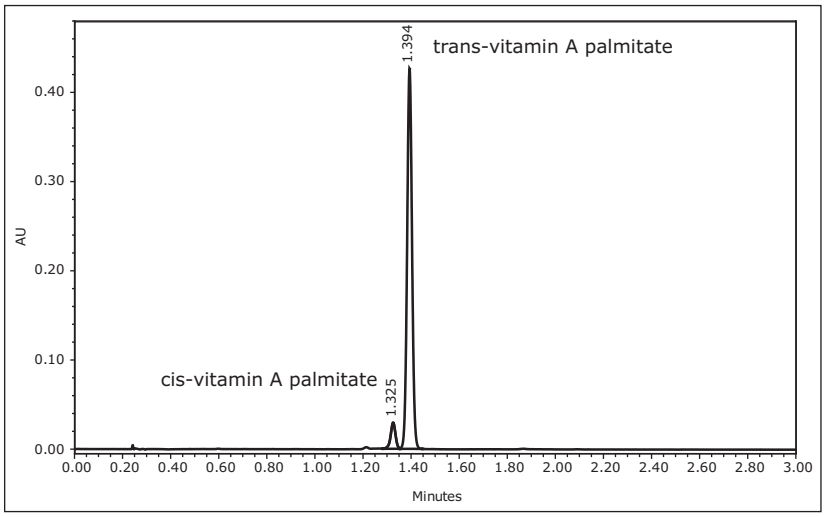

図1 ビタミンAカプセル成分の分離

カラム	ACQUITY UPC^2 HSS C_{18} SB, 3.0×100 mm, 1.8 µm
流量	2.0 mL/min
グラジエント	97 : 3 から 90 : 10　3 分強
移動相　A/B	A : CO_2 / B : メタノール（0.2% ギ酸を含む）
検出器	UV 320 nm（補正 500 ～ 600 nm）
注入量	1 µL
ABPR 圧力	2176 psi
カラム温度	50℃

表2　ビタミンAの分析条件

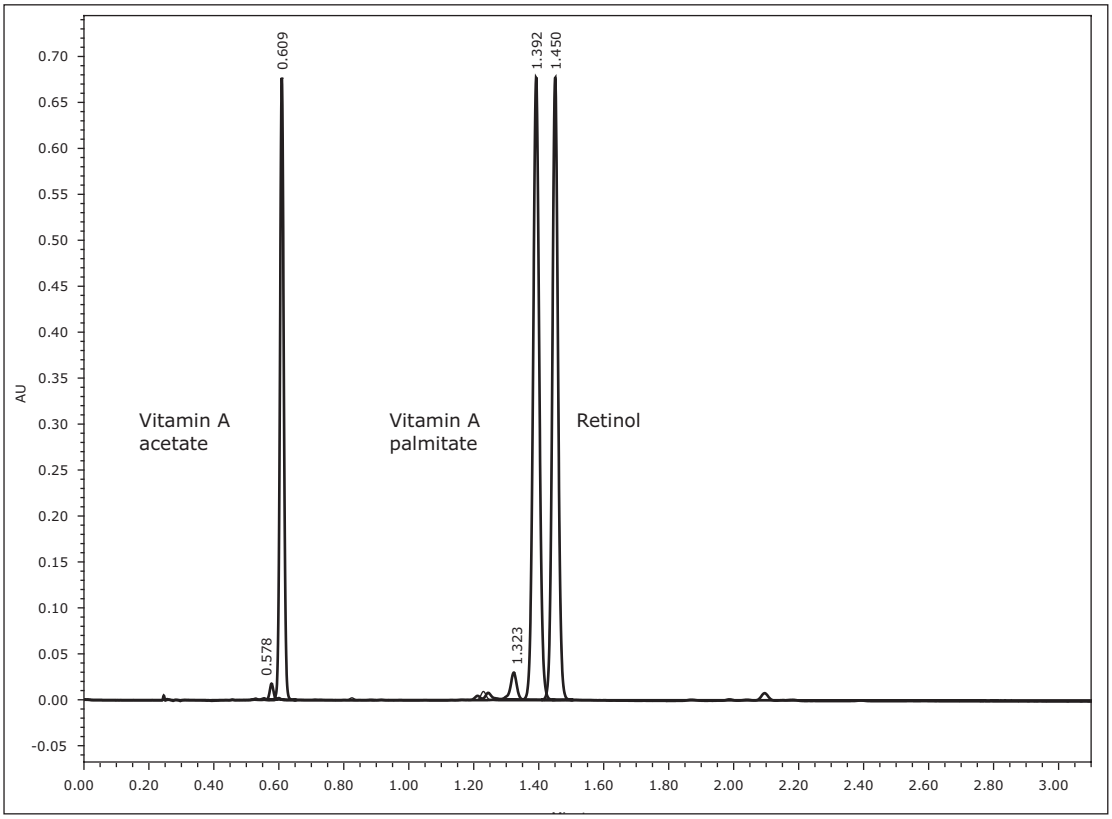

図2　ビタミンA酢酸エステル、ビタミンAパルミチン酸エステル、レチノールの分離

ビタミンA+D3

ビタミン A のみと同様に、魚肝油由来とラベル表示されたビタミン A + D3 製剤には、添加剤として大豆油、ゼラチン、グリセリン、水を含んでいました。ビタミン A パルミチン酸エステルの2つの主要なピーク（シス体とトランス体の異性体、それぞれ 2.626 分と 2.851 分で溶出）は、添加剤ピークより前に溶出します。図 3 で示されるような、製剤中の主な賦形剤原料や他の化合物とビタミン D3（コレカシフェロールは 6.862 分で溶出）との完全な分離を達成するためには、十分な分離効率を持つ長いカラムを使用する必要がありました。図 3 中の拡大図に示すように、このシステムによってビタミン D3 のピークを検出するための十分な感度が得られました。

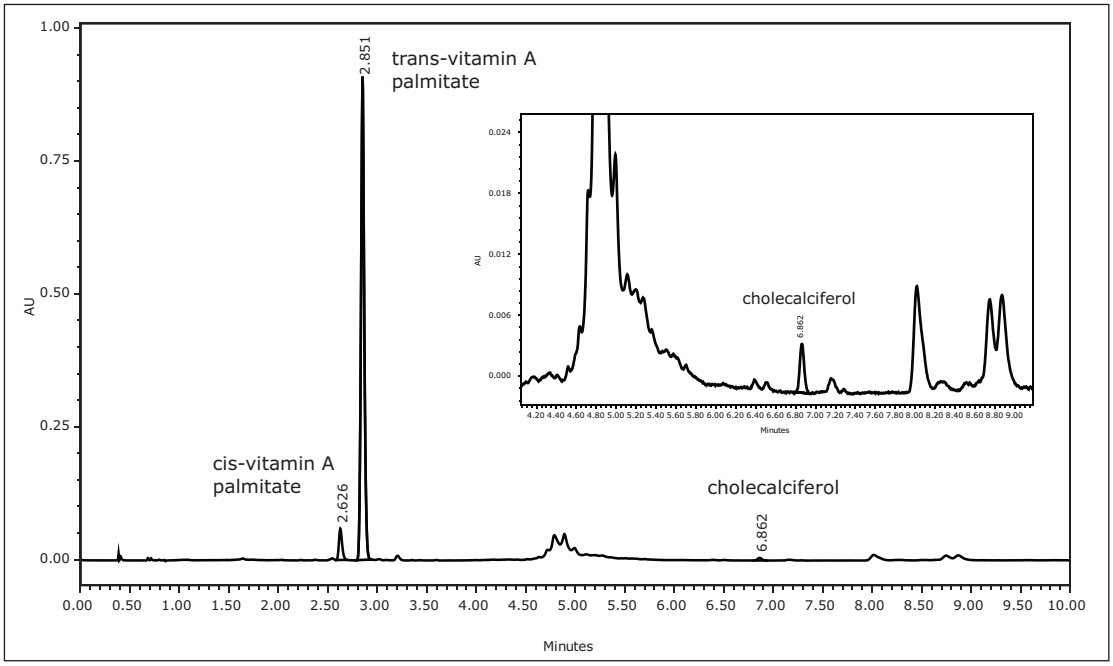

図3 ビタミンA+D3カプセル成分の分離

この分離では、CO_2 / メタノール（0.2% ギ酸を含む）比率 99:1 から 90:10 まで 10 分強のグラジエントを行いました。分析条件詳細を表 3 に示します。

カラム	ACQUITY UPC^2 HSS C_{18} SB, 2.1×150 mm, 1.8 µm
流量	1.0 mL/min
グラジエント	99 : 1 から 90 : 10　10 分強
移動相　A/B	A：CO_2 / B：メタノール（0.2% ギ酸を含む）
検出器	UV 263 nm（補正 500 ～ 600 nm）
注入量	1 µL
ABPR 圧力	2176 psi
カラム温度	50℃

表3　ビタミンA+D3とD3のみの分析条件

ビタミンD3

ヒマワリ油由来とラベル表示された製剤は、表 3 のビタミン A+D3 の分析条件と同一条件で、カプセル賦形剤材料からビタミン D3（コレカルシフェロール、6.867 分）を容易に分離することができました。

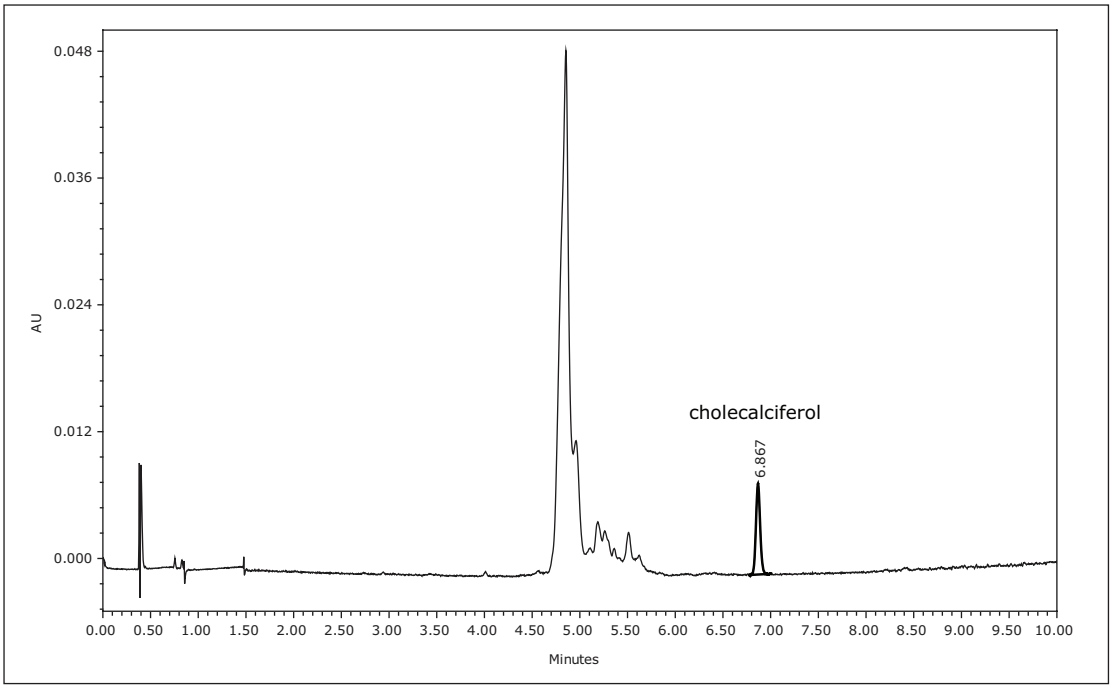

図4　ビタミンD3カプセル成分の分離.

ビタミンE

ビタミン E カプセル中のトコフェロール異性体 4 種 (d-α, d-β, d-γ, d-δ) をベースライン分離するために開発された超高速グラジエント分析（分析時間 90 秒以下）のクロマトグラムを図 5 に示します。この分離では、CO_2 / メタノール（0.2% ギ酸を含む）比率 98:2 から 95 : 5 まで 1.5 分強のグラジエントを行いました。分析条件詳細を表 4 に示します。

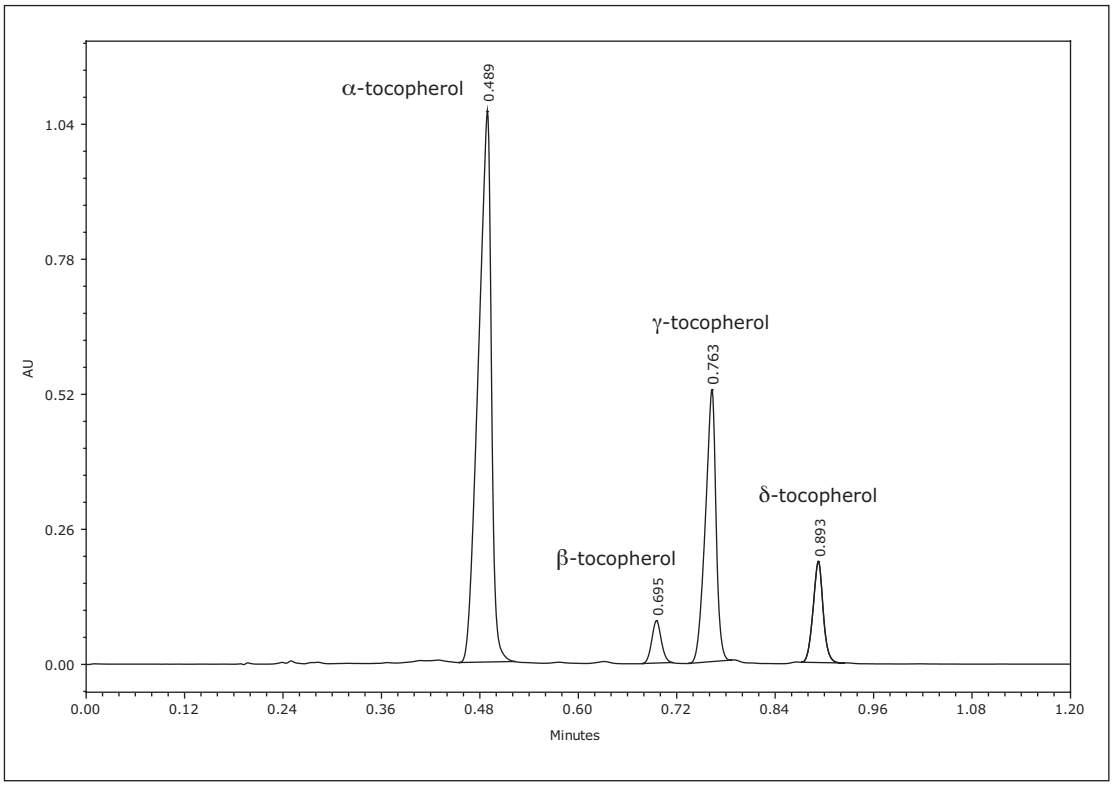

図5　ビタミンEカプセル成分の分離

カラム	ACQUITY UPC^2 BEH, 3.0 × 100 mm, 1.7 µm
流量	2.5 mL/min
グラジエント	98 : 2 から 95 : 5　1.5 分強
移動相　A/B	A : CO_2 / B : メタノール
検出器	UV 293 nm（補正 500 ～ 600 nm）
注入量	1 µL
ABPR 圧力	1885 psi
カラム温度	50℃

表4　ビタミンEの分析条件

ビタミンK1

ビタミン K1 錠剤は、図 6 に示すように CO_2 / (メタノール / アセトニトリル = 1 : 1) = 99 : 1 のシンプルなアイソクラティック条件により完全分離し (RS>2.0)、明確なピークを生成しました。図 7 に示すように両ピークの関連性を表すように UV スペクトル (極大吸収 246 nm) は類似しています。未確認ではありますが (分析の際、各異性体の個別の標準品を使用できなかったため)、2 つのピークは、フィロキノン (ビタミン K) の立体異性体ではないかと推測されます。分析条件詳細を表 5 に示します。

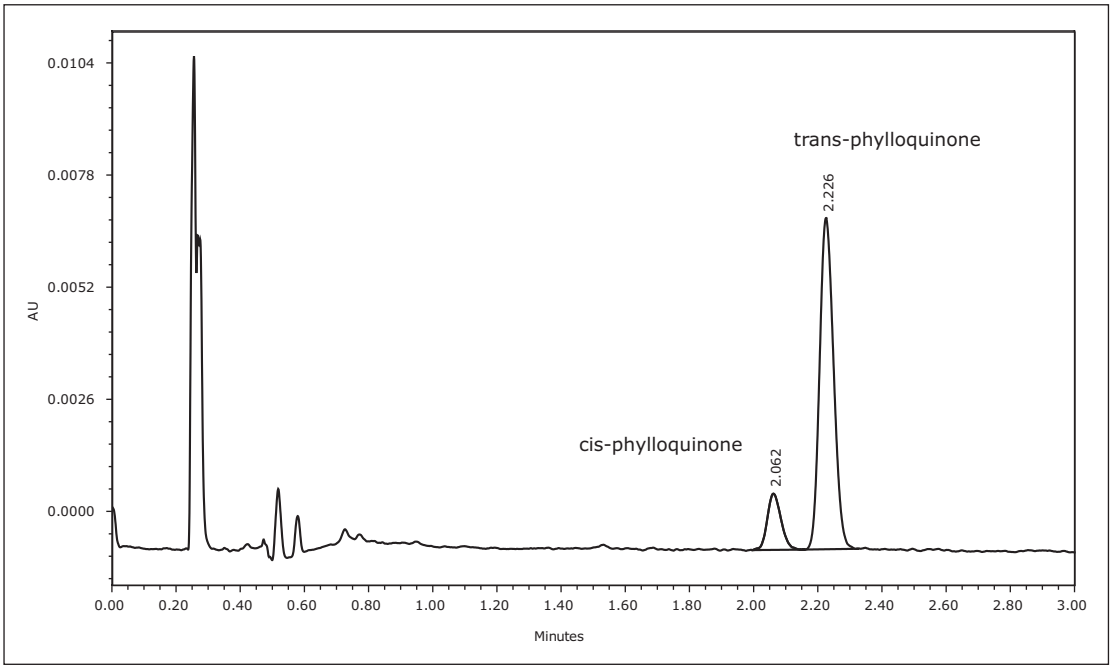

図6　ビタミンK1錠剤成分の分離

カラム	ACQUITY UPC^2 HSS C_{18} SB, 2.1×150 mm, 1.8 µm
流量	1.5 mL/min
アイソクラティック	A / B = 99 : 1
移動相　A/B	A : CO_2 / B : メタノール / アセトニトリル (1 : 1)
検出器	UV 248 nm (補正 300 ～ 400 nm)
注入量	2 µL
ABPR 圧力	1885 psi
カラム温度	50℃

表5　ビタミンK1の分析条件

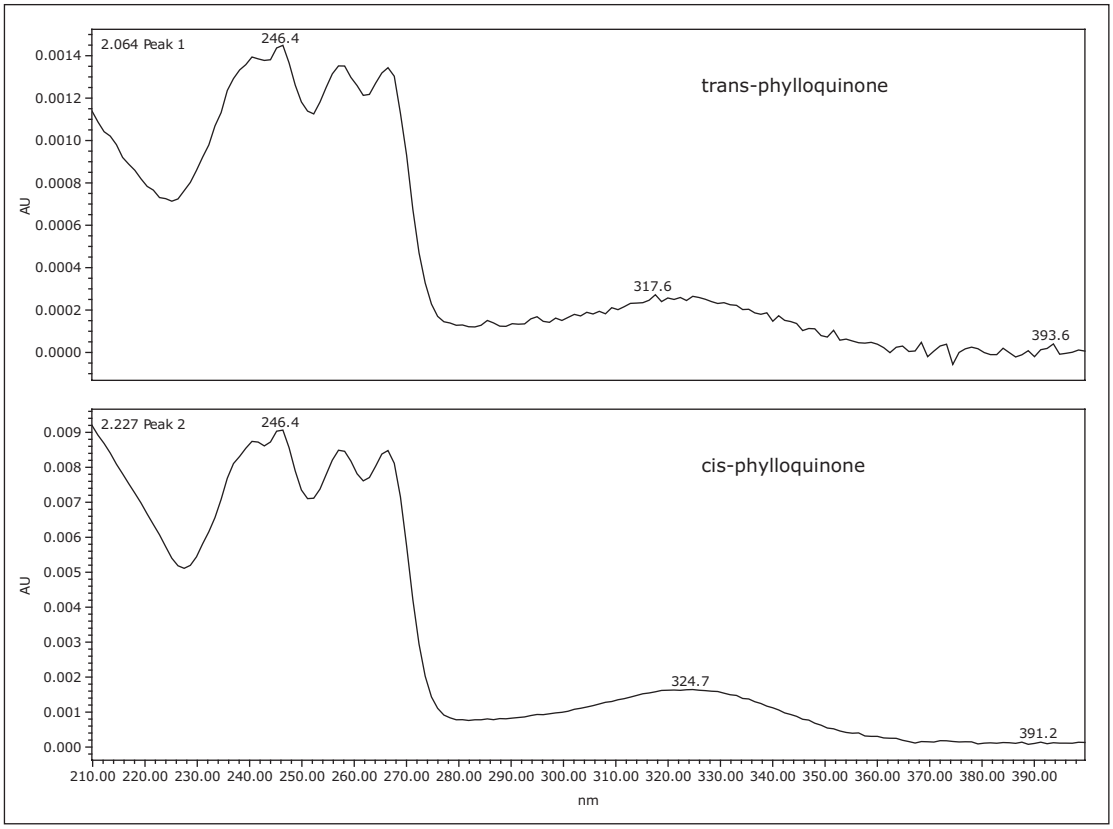

図7　2.064分と2.227分におけるビタミンKのUVスペクトル

ビタミンK2

ビタミン K2 は、メナキノン（MK）の側鎖部分の長さ（不飽和イソプレノイド単位の数）違いで MK-3 から MK-14 等様々な種類があります。この錠剤を CO_2 / メタノール = 95 : 5 のアイソクラティック条件で分析したところ、図 8 に見られるように、主ピークが 1 本といくつかの小さなピークが見られ、MK-7 と同定しました。この結果は、この製剤が主に MK-7 を含んでいるというラベル表示と一致しています。分析条件詳細を表 6 に示します。

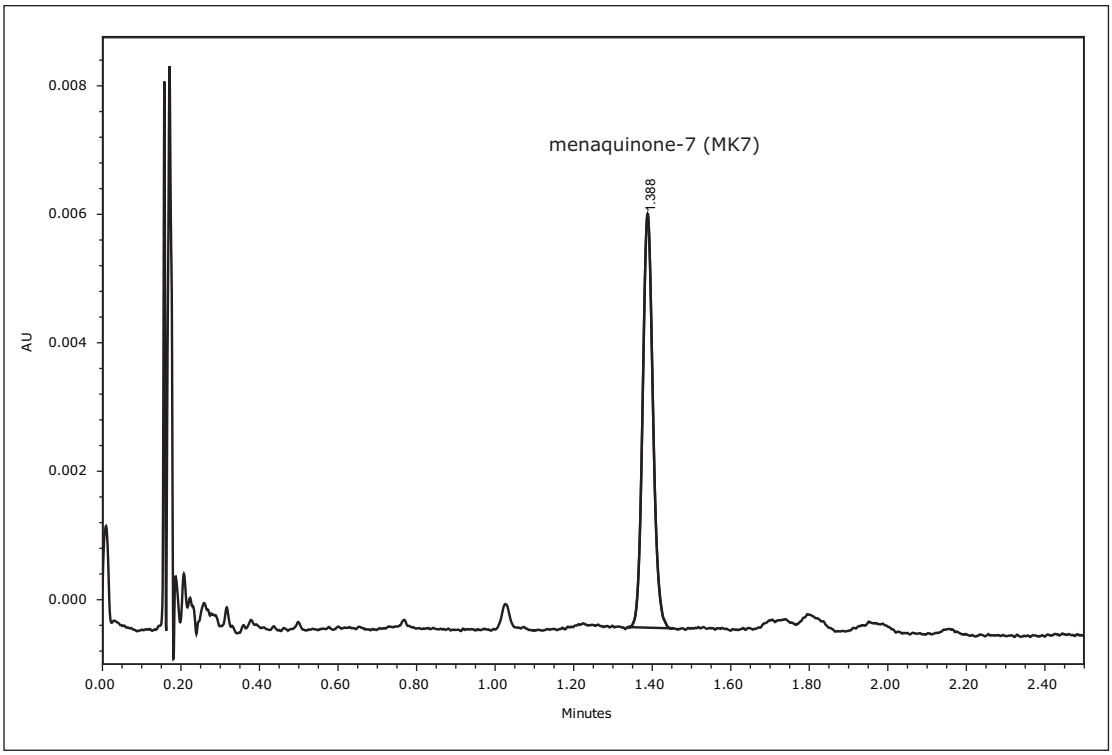

図8　ビタミンK2カプセルの成分の分離

カラム	ACQUITY UPC^2 HSS C_{18} SB, 3.0×100 mm, 1.8 µm
流量	3.0 mL/min
アイソクラティック	95% A : 5% B
移動相　A/B	A : CO_2 / B : メタノール
検出器	UV 248 nm（補正 500 ～ 600 nm）
注入量	1 µL
ABPR 圧力	1885 psi
カラム温度	50℃

表6　ビタミンK2の分析条件

結論

- ACQUITY UPC^2 システムは、6 つの異なる脂溶性ビタミン製剤の分析に成功しました。
- それぞれの脂溶性ビタミン製剤を迅速に分析し、目的成分を医薬品添加物から分離しました。
- ビタミン A、ビタミン E、ビタミン K1 の異性体分離に成功しました。
- このシステムは、複数の装置や異なる分析技術を用いることなく、広範囲な脂溶性ビタミン製剤を分析でき、研究室における脂溶性ビタミン分析を大幅に合理化することが可能です。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社　www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001　東京都品川区北品川1-3-12第 5 小池ビル　TEL 03-3471-7191　FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011　大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F　TEL 06-6304-8888　FAX 06-6300-1734
ショールーム　東京　大阪
テクニカルセンター　東京　大阪　名古屋　福岡　札幌

Watersは Waters Corporationの登録商標です。
ACQUITY UPC^2、UltraPerformance Convergence Chromatography、UPC^2 、Empower および The Science of What's Possible は Waters Corporationの商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2012 Waters Corporation. Printed in Japan. 2012年09月 720004394JA　PDF